FACULTE DE MEDECINE DE PARIS

Année 1962

1096

THESE

pour le

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

L O N G U E T Jacques
Pharmacien de la Faculté de Pharmacie de Paris

né le : 20 Juillet 1925
PARIS IV°

Présentée et soutenue publiquement le 1962

INTERET THERAPEUTIQUE DE LA LYOPHILISATION du BACILLE DE DODERLEIN

Président : Monsieur le Professeur FUNCK-BRENTANO

Office Mécanographique, 36 rue Ballu - PARIS 9ème.

F A C U L T E D E M E D E C I N E D E P A R I S

Année 1962

T H E S E

pour le

DOCTORAT EN MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

L O N G U E T Jacques
Pharmacien de la Faculté de Pharmacie de Paris

né le : 20 Juillet 1925
PARIS IV°

B. UNIV. MEDECINE PARIS

Présentée et soutenue publiquement le 1962

INTERET THERAPEUTIQUE DE LA LYOPHILISATION du BACILLE DE DODERLEIN

Président : Monsieur le Professeur FUNCK-BRENTANO

Office Mécanographique, 36 rue Ballu - PARIS 9ème.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

1-2-1962

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. ALAJOUANINE (T), AUBIN (A), BENARD (H), BULLIARD (H), CADENAT (F), CHABROL (E), CHAMPY (C), DEBRE (R), FEY (B), GASTINEL (P), HALPHEN (E), HAZARD (R), HEUYER (G), LANTUEJOUL (P), LAROCHE (G), LEVY-SOLAL (E), LIAN (C), MATHIEU (P), MOCQUOT (P), MONDOR (H), MONOD (R), MOREAU (R), MOULONGUET (P), OLIVIER (E), PASTEUR VALLERY-RADOT, PETIT-DUTAILLIS (D) QUENU (J), RICHET (C), SENEQUE (J), STROHL (A), TANON (L).

DOYEN ..... Léon BINET
Membre de l'Institut

1er ASSESSEUR ..... Jean VERNE
2ème ASSESSEUR ..... Gaston CORDIER

I.- PROFESSEURS

1°- CHAIRES DE SCIENCES FONDAMENTALES

a) Professeurs titulaires :

	MM.
Anatomie	DELMAS (A)
Anatomie pathologique	DELARUE (J)
Anesthésiologie	BAUMANN (J)
Biochimie Médicale	JAYLE (MF) / SCHAPIRA (G)
Biologie appliquée à l'Education physique et aux Sports	CHAILLEY-BERT (P)
Biologie médicale	FAUVERT (R)
Cancérologie médicale et sociale	BERNARD (J)
Embryologie	GIROUD (A)
Histoire de la médecine et de la chirurgie (Lariboisière)	N...
Histologie	VERNE (J)
Hygiène et médecine préventive	JOANNON (P)
Médecine du Travail	DESOILLE (H)
Médecine Légale	PIEDELIEVRE (R)
Microbiologie (Bactériologie et virologie)	FASQUELLE (R)
Parasitologie	GALLIARD (H)
Pathologie chirurgicale	HUGUIER (J)
Pathologie exotique	LAVIER (G)
Pathologie expérimentale et comparée	MERKLEN (F-P)
Pathologie médicale	MILLIEZ (P)
Pathologie respiratoire	TURIAF (J)
Pathologie et thérapeutique générales	BOUDIN (G)
Pharmacologie	CHEYMOL (J)
Physiologie	BINET (L) / BARGETON (D)
Physiologie et pathologie obstétricale	LEPAGE (F)
Physique médicale	DOGNON (A) / DJOURNO (A)
Radiologie médicale	DESGREZ (H)
Technique chirurgicale et chirurgie expérimentale	N...
Thérapeutique	CONTE (M)

b) Professeurs à titre personnel :

Biochimie médicale	DESGREZ (P) / POLONOVSKI (J)
Biologie médicale	BOURLIERE (F)
Embryologie	TUCHMANN (H)
Hygiène et médecine préventive	DEPARIS (M)
Parasitologie	BRUMPT (LC)
Pathologie chirurgicale	LAURENCE (G)
Pharmacologie	LEVE (Melle J)
Physiologie	PARROT (J)
Physique médicale	KELLERSHOHN (L)

2°- CHAIRES DE SCIENCES CLINIQUES

a) Professeurs titulaires :

	MM.
Clinique carcinologique chirurgicale (Necker)	REDON (H)
Clinique cardiologique (Broussais)	MOUQUIN (M)
Cliniques chirurgicales — Beaujon	LORTAT-JACOB
Cliniques chirurgicales — Cochin	LEGER (L)
Cliniques chirurgicales — Hôtel-Dieu	PATEL (J)
Cliniques chirurgicales — Pitié	CORDIER (G)
Cliniques chirurgicales — Saint-Antoine	GOSSET (J)
Cliniques chirurgicales — Salpétrière	SICARD (A)
Cliniques chirurgicales — Tenon	OLIVIER (Cl)
Clinique de Chirurgie infantile et orthopédique (Enfants Malades).	FEVRE (M)
Clinique chirurgicale orthopédique et réparatrice (Cochin)	MERLE d'AUBIGNE (R)
Clinique de chirurgie cardio-vasculaire (Broussais)	GAUDART d'ALLAINES (F de
Clinique de chirurgie pleuro-pulmonaire (Laennec)	MATHEY (J)
Clinique endocrinologique (Pitié)	DECOURT (J)
Clinique de Génétique Médicale (Enfants Malades)	LAMY (M)
Clinique gynécologique (Broca)	FUNCK-BRENTANO
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques (Saint-Louis)	DEGOS (R)
Clinique des Maladies des Enfants (Enfants Malades)	CATHALA (J)
Clinique des maladies infectieuses (Claude-Bernard)	MOLLARET (P)
Clinique des maladies mentales et de l'encéphale (Sainte-Anne)	DELAY (J)
Clinique des maladies métaboliques (Necker)	HAMBURGER (J)
Clinique des maladies du sang (Broussais)	MARCHAL (G)
Clinique des maladies du système nerveux (Salpétrière)	CASTAIGNE (P)
Cliniques médicales — Boucicaut	LENEGRE (J)
Cliniques médicales — Broussais	SOULIE (P)
Cliniques médicales — Cochin	JUSTIN-BESANCON (L)
Cliniques médicales — Cochin	BROUET (G)
Cliniques médicales — Hôtel-Dieu	BARIETY (M)
Cliniques médicales — Lariboisière	SEZE (S. de)
Cliniques médicales — Pitié	DREYFUS (G)
Cliniques médicales — Saint-Antoine	KOURILSKY (R)
Clinique médicale d'hydrologie thérapeutique et Climatologie (Bichat)	DEBRAY (C)

Clinique médicale propédeutique (Broussais)	GENNES (L. de)
Clinique médico-sociale du diabète sucré et des maladies de la nutrition (Hôtel Dieu)	DEROT (M)
Clinique de neuro-chirurgie (Pitié)	DAVID (M)
Clinique neurologique (Salpétrière)	GARCIN (R)
Cliniques Obstétricales — Baudeloque	LACOMME (M)
Cliniques Obstétricales — Foch (Suresnes)	MERGER (R)
Clinique obstétricale et gynécologique (Port Royal)	VARANGOT (J)
Clinique ophtalmologique (Hôtel Dieu)	RENARD (G)
Clinique oto-rhino-laryngologique (Lariboisière)	AUBRY (M)
Clinique de pédiatrie et de puériculture (Saint-Vincent de Paul)	LELONG (M)
Clinique de pédiatrie sociale (Enfants Malades)	MARIE (J)
Clinique de pneumo-phtisiologie (Laennec)	BERNARD (E)
Clinique de neuro-psychiatrie infantile (Salpétrière)	MICHAUX (L)
Clinique de rhumatologie médicale et sociale (Cochin)	COSTE (F)
Clinique Stomatologique (Pitié)	DECHAUME (M)
Clinique thérapeutique chirurgicale (Vaugirard)	ROUX (M)
Clinique Thérapeutique médicale (Saint-Antoine)	LEMAIRE (A)
Clinique toxicologique	GAULTIER (M)
Clinique traumatologique	PADOVANI (P)
Séméiologie médicale	DOMART (A)
Séméiologie et clinique chirurgicale	POILLEUX (F)
Clinique Urologique (Necker)	COUVELAIRE (R)
Hygiène de la première enfance (Trousseau)	TURPIN (R)

b) Professeurs à titre personnel :

Médecins	BOUR (H) LHERMITTE (F) PEQUIGNOT (H)

II - PROFESSEURS SANS CHAIRE, PROFESSEURS AGREGES ET MAITRES DE CONFERENCES - AGREGES

Anatomie	CABROL (C) COUINAUD (C) GILLOT (C) OLIVIER (G)
Anatomie Pathologique	GAUTHIER-VILLARS (Melle P) Pr. s. ch. ABELANET (R) BUSSER (F) CHOMETTE (G) GOUYGOU (Ch)M. Conf) NEZELOFF (Ch) ORCEL (L) PAILLAS (J)
Orthopédie	JUDET (R) MEARY (R) POSTEL (M) RAMADIER (J)
Oto-Rhino-Laryngologie	DEBAIN (J) PIALOUX (P)
Parasitologie	GOLVAN (Y) LAPIERRE (J)

Anesthésiologie	KERN (E) VOURC'H (G)
Bactériologie	BARBIER (P) CHRISTOL (D) LE MINOR (L) TOURNIER (P)
Biochimie Médicale	BAULIEU (Et. M.Conf.) BOURILLON (R) CARTIER (P.) DREYFUS (J.-Cl) GONNARD (P.) KRUH (J) JEROME (H)
Biologie appliquée à l'éducation physique et aux Sports	PLAS (F)
Carcinologie	BOIRON (M) DENOIX (P) MATHE (G) SELIGMANN (M)
Dermato-Syphiligraphie	CIVATTE (J) DUPERRAT (B)
Electro-Radiologie	LEDOUX-LEBARD (G)
Hématologie	BESSIS (M) BILSKI-PASQUIER (G) DAUSSET (J) DUHAMEL (G)
Histologie	COUJARD (R) Pr. s. ch. MAROIS (M) RACADOT (J)
Hydrologie	BESANCON (F) CORNET (A)
Hygiène	BOYER (J) Pr.s.Ch. BLANCHER (G) CORRE-HURST (Me L) SAPIN-JALOUSTRE (H)
Maladies Infectieuses	BASTIN (R) DUPONT (V)
Médecine Légale	DEROBERT (L) Pr. s. Ch. FOURNIER (E) GUENIOT (M) HADENGUE (A)
Pathologie Chirurgicale	BARCAT (J) BINET (J.P.) CAUCHOIS (J) CERBONNET (G) CHATELIN (C-L) DUBOST (Ch) DUBOST (Cl) FAUREL (J) FLABEAU (F) GARBAY (M) GARNIER (H) Cl. de GAUDART-d'ALLAINES GERMAIN (A) LATASTE (J) LEVEQUE (B) LOYGUE (J) MERCADIER (M) NATALI (J) PELLERIN (D) PERROTIN (J) ROBERT (H) THOMERET (G)
Pathologie Exotique	SCHNEIDER (J)
Pathologie Expérimentale	BENHAMOU (J.P.) BERTHAUX (P) BOIVIN (P) CROSNIER (J) HARTMANN (L) LOEPER (J) MAURICE (J) MIKOL (Cl) RICHET (G)
Pathologie Médicale	AUSSANNAIRE (M) BOUVIER (J) BOUVERAIN (Y) BRICAIRE (H) BRISSAUD (H) BROCARD (H) BUGE (A) CATINAT (J) CHRETIEN (J) COBLENTZ (B) CONTAMIN (F) COURY (C) ETIENNE (J.P) FREZAL (J) FRITEL (D) HENNEQUET (A) HIMBERT (J) HOUSSET (E) LAROCHE (Cl) LESOBRE (R)

Médecine du Travail	ALBAHARY (C)
Neuro-Chirurgie	PERTUISET (B
Obstétrique	GRANJON (A) HERVET (E) LE LORIER (G) LEVY (J) MORIN (P) MUSSET (R) ROBEY (M) SENEZE (J) SUREAU (C) THOYER ROZAT (J)
Ophtalmologie	BREGEAT (P) DUBOIS (A) SARAUX (H)
Pharmacologie	BOISSIER (J) LECHAT (P)
Physiologie	BARRES (G) DEJOURS (P) DURAND (J) GIRARD m. conf. HUGELIN (A) SCHERRER (J)
Physique médicale	CHANTEUR (J) GOUGEROT (L) m. conf. pr. s. ch. GREMY (F) m. conf. MILHAUD (G) PELLERIN (P) ROUCAYROL (J. Cl) TUBIANA (M) m. conf.
Pneumo-Phtisiologie	KREIS (B) MEYER (A) RENAULT (P)
Pathologie Médicale (suite)	MACREZ (C) MOREAU (L) NICK (J) ROYER (P) TOURNEUR (R) WOLFROMM (R)
Pédiatrie - Puériculture	JOSEPH (R) LAFOURCADE (J) LEPERCQ (G) MANDE (R) MOZZIGONACCI (P) POLONOVOSKI (C) ROSSIER (A) VIALATTE (J)
Psychiatrie	PICHOT P)
Psychiatrie Infantile	DENIKER (P) DUCHE (D) FLAVIGNY (H) LAPRESLE (J)
Rhumatologie	DELBARRE (F)
Stomatologie	CERNEA (P) CHAPUT (Me A) m.c. agr. GRELLET (M)
Thérapeutique	CHASSAGNE (P) LAMOTTE (M) MARCHE (M)
Urologie	AUVERT (J) MOULONGUET (A) QUENU (L)

III - PROFESSEURS SANS CHAIRE ET AGREGES CHARGES DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE
à titre permanent

	MM.		MM.
Anatomie	DEBEYRE (J)	Clinique Ophtalmologique	DESVIGNES (P) OFFRET (G)
Clinique chirurgicale	ABOULKER (P) AMELINE (A) pr.s.Ch. VERNE (J.M.)	Clinique oto-rhino-laryngologique	MADURO (R)
Clinique Médicale	PERRAULT (M) RAMBERT (P) THIEFFRY (S)	Clinique pédiatrique et puériculture	LAPLANE (R)
		Clinique psychiatrique	BARUK (H)
Clinique Obstétrique	GRASSET (J) MAYER (M)	Clinique urologique	KUSS (R)

IV - PROFESSEURS DETACHES DANS LES UNIVERSITES ETRANGERES.

Bactériologie ..... HAUDUROY (P) Pr.s.Ch.

Pathologie chirurgicale ..... RUDLER (J) Pr.s.Ch.

V - CHARGES DE COURS d'HYGIENE SCOLAIRE ET UNIVERSITAIRE ..... BOLTANSKI (E)
LAUNAY (C)

Secrétaire général de la Faculté ..... M. LENA (J)

Secrétaire principal ..... Mlle CHAINTREUIL (G)

Conservateur en Chef de la Bibliothèque
Conservateur du Musée d'Histoire de la Médecine ..... M. le Docteur HAHN (A)

Conservateur ..... Mlle DUMAITRE (P)

Bibliothécaires ..... Mmes CONTET (J), FORGET (F)
Mlles LAURENT (H), LE NOIR (G), QUIEVREUX (E)

A mon Père,

A ma Femme,

A mes Enfants.

A Monsieur le Professeur FUNCK BRENTANO

Professeur de Clinique Gynécologique à
la Faculté de Médecine de Paris

Membre de l'Académie Nationale de Médecine
Membre de l'Académie Nationale de Chirurgie

Chirurgien de l'Hôpital Broca

qui a bien voulu me faire l'honneur d'accepter
la présidence de cette Thèse.

En témoignage de ma respectueuse reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Agrégé GRASSET

Gynécologue-Accoucheur de
l'Hôpital de La Pitié

en témoignage de ma sincère reconnaissance,
pour ses conseils qui nous ont été des plus
précieux.

A Monsieur le Professeur CHAPPAZ

Gynécologue-Accoucheur
des Hôpitaux de REIMS

dont les travaux sur la Flore Vaginale et l'expérience clinique nous ont guidés dans la conduite de nos expérimentations .

Sincère reconnaissance.

A Monsieur le Professeur THIEULIN

Agrégé des Ecoles Vétérinaires

A Monsieur le Lieutenant-Colonel HENAFF

Chef du Service de Lyophilisation au
Centre de Transfusion et Réanimation
de l'Armée (Clamart)

en remerciement des conseils éclairés dont ils ont bien voulu me faire bénéficier.

I N T R O D U C T I O N

L'évolution de la thérapeutique moderne dans les vingt dernières années, a été marquée entre autres, par l'utilisation des antibiotiques, agents très actifs dans la lutte contre les bactéries pathogènes, mais dont l'action polyvalente s'étend à toute une flore saprophyte indispensable à l'organisme.

Cette action secondaire peut être compensée suivant les cas, par apport des métabolites synthétisés habituellement par cette flore saprophyte ou par réensemencement de souches bactériennes appropriées.

Notre but, dans ce travail, a été de fournir à la thérapeutique des Bacilles de Döderlein sous forme d'une poudre sèche, qui pourrait être incorporés dans un véhicule approprié et surtout de manipulation plus facile que les suspensions de ce même Bacille en milieu liquide, qui sont, à l'heure actuelle, à la disposition du praticien.

La meilleure technique est la lyophilisation : procédé physique, permettant la sublimation directe de la glace solide à l'état de vapeur d'eau dans un vide très poussé sous passage, par une phase eau liquide; l'intérêt de cette méthode, lorsqu'on travaille des bactéries, réside dans le fait que l'on respecte les conditions de température et d'isotonie compatible avec une survie des germes.

Nous avons donc été amenés à préciser une technique de lyophilisation et une technique de contrôle d'efficacité du procédé avant de rechercher l'influence possible de la lyophilisation sur la morphologie et les caractéristiques bactériologiques du germe.

La clinique, enfin, devant en dernier lieu et avec une place de choix être le dernier et le seul vrai critère d'efficacité.

C H A P I T R E I

Le BACILLE de DÖDERLEIN

La découverte du Bacille de Döderlein fut la conséquence des premières études de la flore vaginale et de sa pathologie. Ces études, dans la pensée de leurs auteurs, devaient amener à la mise en évidence dans le vagin, d'un certain nombre de germes pathogènes capables, dans certaines conditions, d'exalter leur virulence.

Leurs résultats furent assez différents, car ils s'aperçurent que la flore vaginale normale non seulement ne renferme aucun germe pathogène; mais joue, au contraire, un rôle éminemment antiseptique.

Ce fut Döderlein qui décrivit, en 1892, un bacille long, immobile prenant le GRAM anaérobie facultatif.

Etant donné la facilité avec laquelle le Bacille de Döderlein se présente sous des formes involutives, de nombreux bactériologistes l'ont étudié.

Sans vouloir les citer tous

- ROTHER (1921) qui le classe dans le groupe général des Bacilles Lactiques.
- SCHRODER et HINRICHS en font une étude comparative avec le Lactis Acidophilus et le Lactis Aerogènes.
- CRUICKSCHANK (1931) lui consacre une étude importante, décrit trois types morphologiques et conclut que le "Bacille de Döderlein et les autres Lactobacilles ne sont pas sérologiquement identiques".
- BROWN et REDOWITZ, confirment ce travail, ainsi que GINSBOURG. Pour ces auteurs, le Bacille de Döderlein fait partie du genre Acidophilus, tout en restant une variété très individualisée.
- ROUSSEAU le classe comme un "Acidogène et non pas comme un Lactique vrai".
- CHAPPAZ, enfin, dans une étude très détaillée, confirme les travaux de CRUICKSCHANK.

../..

Le Bacille de Döderlein appartient au genre LACTOBACILLUS.

Ses différentes synonimies sont les suivantes :

BACILLUS VAGINAE ..... KRUSE (1892)

BACILLUS VAGINALIS LONGUS ..... HEURLIN (1910)

BACILLUS VAGINALIS ..... JOTTEN (1922)

ACIDO BACTERIUM DOEDERLEIN ..... HEIM (1925)

PLOCAMO BACTERIUM VAGINAE ..... LEMTANN (1927)

LACTO BACILLUS DODERLEIN ..... GILLESPIE et RETTGER (1938)

Au point de vue morphologique, c'est un bacille de 0,6 à 1 µ sur 1,5 à 6 µ non mobile, revêtant facilement des formes involutives très bien décrites par CRUICKSCHANK.

a) type le plus commun, bâtonnet assez épais, pouvant présenter à fort grossissement, une vacuole linéaire centrale.

b) Coccobacilles moins fréquents, à ne pas confondre avec de gros coccis.

c) Streptobacilles qui se rencontrent surtout dans les cultures jeunes.

C'est un Bacille GRAM Positif aérobie anaérobie facultatif.

Il présente les particularités suivantes :

- Produit de l'acide lactique racémique ou dextrogyre par fermentation du lactose.
- Produit une fermentation acide avec les hydrates de Carbone suivants : Glucose, Levulose, Galactose, Arabinose, Maltose, Saccharose, Mannitol, Xylose.
- Ne produit pas de gaz.
- Ne liquéfie pas la gélatine.
- Enfin, n'est pas pathogène pour les animaux de laboratoire.
- Température optima de culture 37°, minima 22°, maxima 43°.

../..

Hôte normal du vagin féminin dans 50 à 80 % des cas, il en entretient l'acidification par fermentation du glycogène, maintenant le pH inférieur à 5.

Nous avons produit le Bacille de Döderlein en milieu liquide ensemencé avec souche pure, culture durant 48 heures à l'étuve à 37°, récolte du culot de centrifugation dans des conditions aseptiques (centrifugeuse JOUAN à quatre Pots de un litre en acier chromé).

Nous prions le lecteur de nous excuser de ne pouvoir donner la composition exacte du milieu de culture, la formule nous ayant été gracieusement communiquée par un Laboratoire pharmaceutique qui s'oppose à sa divulgation.

CHAPITRE II

ETUDE de l'APPAREILLAGE UTILISE

Nous rappellerons, tout d'abord, que la technique de lyophilisation consiste en une dessication effectuée à basse température à partir de spécimens congelés au préalable et obtenue en sublimant la glace sous pression réduite.

Dans ces conditions, il n'y a pas apparition de phase liquide, mais passage direct de glace solide à l'état de vapeur d'eau.

Au point de vue biologique, l'intérêt de cette technique réside dans la possibilité d'obtenir une deshydratation très poussée d'un organisme vivant à une température largement inférieure à 0°, c'est-à-dire pratiquement dans un état de vie très ralentie.

L'appareil à lyophiliser le plus simple comprendra donc essentiellement trois éléments :

- Une chambre de dessication sous pression réduite.
- Un piège offrant à la vapeur d'eau sublimée une paroi froide.
- Un groupe pompe à vide nécessaire pour maintenir l'ensemble à une pression réduite adéquate.

Quant à la lyophilisation, elle comprendra toujours deux temps :

- La congélation.
- La lyophilisation proprement dite.

APPAREILLAGE pour la CONGELATION

Cette phase préliminaire a pour but d'amener la substance à lyophiliser à l'état congelé. Elle revêt une importance primordiale surtout lorsqu'il s'agit d'organismes vivants, dont nous désirons assurer la survie à l'état deshydraté.

../..

Plusieurs facteurs interviennent; nous allons les passer en revue :

a) La vitesse de congélation qui doit de préférence être élevée lorsqu'il s'agit d'organismes vivants pour éviter les effets nocifs qui seront dûs à l'apparition de solutions hypertoniques, après cristallisation des mélanges eutectiques.
Il est d'autre part intéressant d'aboutir à une cristallisation très fine, de façon à obtenir un culot de lyophilisation aussi homogène que possible.

b) L'épaisseur du produit à congeler, les caractéristiques de forme et de matériau du récipient recevant le produit à lyophiliser, interviennent évidemment en premier lieu.

c) L'étude de la température finale de congélation doit nous permettre d'assurer qu'il n'y a plus de phase liquide en fin de congélation.
Dans notre étude, nous avons utilisé plusieurs sources de froid, en vue de tester les conditions optima de congélation du bacille.

Dans l'ordre des températures décroissantes, ce sont :

- Le mélange glace pilée-sel marin, assurant une température de l'ordre de -15° environ permettant un refroidissement du produit pour l'amener aux environs de 0° assez rapidement. La congélation en masse étant obtenue en soumettant le produit à un vide progressif, il se produit dans ces conditions une évaporation rapide de la surface liquide qui entraîne un abaissement de température suffisant pour congeler la masse.

Cette méthode, décrite par GREAVES n'est pas sans inconvénients car l'ébullition qui apparaît à partir d'une certaine pression peut entraîner : soit la formation d'une masse congelée à l'aspect d'éponge où les échanges thermiques se font mal; soit le débordement des récipients sous forme de mousse.

Nous avons dû abandonner cette technique après essais, pour les raisons exposées ci-dessus.

- L'alcool dénaturé refroidi à - 45°. L'appareillage est constitué d'un bac pourvu de deux agitateurs afin d'assurer un brassage constant, entraînant une plus grande homogénéité de température dans l'ensemble de la masse.
  Dans cette cuve, se trouve la partie froide au condenseur d'un circuit frigorigène fonctionnant par détente de Fréon 12 (Appareillage USIFROID).
- La Carboglace ou neige carbonique comprimée. Il est d'ailleurs préférable de l'employer concassée, dans un bain d'alcool dénaturé, pour avoir de meilleurs échanges thermiques avec les récipients contenant le produit à lyophiliser.
- Le mélange carboglace - alcool dénaturé donne une température de l'ordre de - 80°.

Nous citerons, pour mémoire, le refroidissement par circulation d'air froid que nous avons, délibérément, écarté car étant de trop longue durée (Technique USIFROID).

Nous avions, en outre, la possibilité de stocker durant un temps plus ou moins long, les produits ainsi congelés dans une enceinte prévue à cet effet et à une température maintenue à - 27°.

../..

Afin de fixer les idées sur la rapidité de congélation, les ampoules que nous avons utilisées comme contenant de la suspension de Bacilles passent :

- de + 28° à - 30° en 1'40" dans le bain d'alcool à - 45°
- de + 28° à - 30° en 1'20" dans le mélange Carboglace-Alcool.

APPAREILLAGE DE LYOPHILISATION

Nous avons disposé, pour nos essais, de deux appareillages. UN appareil type laboratoire et UN appareil industriel, le S.M.U., construit par les Etablissements USIFROID.

L'appareil de laboratoire très aimablement mis à notre disposition par le Lieutenant Colonel HENAFF du Centre de Transfusion de l'Armée et construit sur des plans, constitue l'appareil le plus simple et aussi le plus pratique à utiliser pour les essais.

Réalisé en tôle d'acier chromé, il possède deux des trois éléments essentiels :

- Une cuve cylindrique de 20 cms de diamètre et de 25 cms de hauteur, fermée à sa partie supérieure par une plaque de verre épais avec joint de caoutchouc plat, à sa partie inférieure une série d'ailettes métalliques facilitant les échanges thermiques lorsqu'on désire refroidir ou réchauffer le fond de cuve. Enfin, latéralement et en haut de la cuve, se trouve une large tubulure en relation avec :

../..

- le piège qui est un vase de DEWAR réalisé dans le même matériau. La capacité de la cuve est de l'ordre de 1 litre 500 destinée à recevoir le mélange réfrigérant alcool + carboglace. Une tubulure inférieure permet l'évacuation de l'eau après décongélation du piège, une autre tubulure est en communication avec :
  - la pompe à vide. Celle que nous avons utilisée est une pompe à palettes BALZERS.

Pour la surveillance en cours de lyophilisation, nous disposons :

- de la lecture directe de la température par un thermomètre à alcool dont la colonne est coudée à angle droit, permettant ainsi de suivre les variations à travers le couvercle de verre.
- de la lecture des indications de pression sur le cadran d'une jauge PYROVAC de la Compagnie Générale de Radiologie; appareil utilisant le principe de la jauge de PIRAI, variations de la résistance d'un filament métallique en fonction de la température. Celle-ci s'accroît d'autant plus vite que les pertes par convection sont plus faibles, ce qui est le cas pour des vides de plus en plus poussés.

L'appareil industriel est construit par les Etablissements USIFROID de type S M U et que nous décrirons sommairement :

- La cuve de dessication cylindrique de 1 mètre de diamètre et de 1 mètre de hauteur, peut recevoir une série de plateaux disposés en "pile d'assiettes". Ces plateaux reçoivent les contenants des produits à lyophiliser et possèdent, dans leurs fonds, des résistances électriques noyées dans la masse, afin de fournir l'apport calorique nécessaire à la sublimation de la glace.

../..

- Le piège est constitué d'un serpentin cylindrique sur toute la hauteur de la cuve refroidi par détente de Fréon 12.

Le groupe pompe à vide est le même que celui décrit plus haut, sur lequel nous avions d'ailleurs branché notre appareillage d'essai.

Le contrôle de la marche des opérations est ici installé d'une façon semi-automatique.

Pour les lectures de température, une série de sondes thermométriques à résistance qui peuvent être mises en circuit avec un galvanomètre directement gradué en degrés. Il existe trois séries de sondes :

- Celle qui relie au condenseur donnant la température de la source froide,
- Celles noyées dans la masse à lyophiliser.
- Celles noyées dans les plateaux supports et qui fournissent les calories nécessaires à la sublimation de la glace.

Pour les lectures de pression, un manomètre métallique donne les variations entre la pression atmosphérique et 75 centimètres de Mercure, un tube utilisant les décharges dans les gaz raréfiés permettant de suivre les variations au-delà des possibilités du manomètre métallique.

Un appareillage à réglage thermostatique permet le chauffage des plateaux à une température déterminée durant toute l'opération.

CHAPITRE III

MISE au POINT d'UNE TECHNIQUE d'ESSAI

Afin de pouvoir étudier l'influence des différentes variables susceptibles d'agir au cours de la lyophilisation, nous avons été contraints, dès le début de notre travail, d'établir un essai de lyophilisation type sans cesse reproduit à l'exception d'un de ces facteurs afin d'en déterminer la valeur.

Nous avons donc opéré systématiquement avec l'appareillage d'essai décrit plus haut et dans les conditions suivantes :

- Congélation de la suspension microbienne répartie dans des ampoules de 5 ml à fond plat, col éclaté, stérilisées et bouchées au coton cardé dans le mélange alcool carboglace. Chaque ampoule reçoit un ml de suspension.

- Lyophilisation sans apport de calories autres que celles fournies par l'air ambiant $\not\equiv$ 20° dans ces conditions la lyophilisation demande environ 10 heures.

- La lecture des appareils de contrôle donne les résultats suivants :

Temps	Température	Pression (en millimètres de Hg)
0	- 25°	Atmosphérique
3'	- 35°	8.10 - 1
5'	- 40°	5.10 - 2
25'	- 40°	1.10 - 2
1 heure	- 27°	9.10 - 3
4 heures	- 10°	
6 heures	- 4°	
8 heures	+ 10°	
12 heures	+ 14°	3.10 - 3

../..

Ces chiffres donnent une indication de la marche des opérations toujours sensiblement les mêmes au cours de nos essais.

Nous attirerons l'attention du lecteur sur trois points :

- La chute de température brutale qui se produit au début de la sublimation.
- La dissociation qui existe entre la lecture de température et la lecture de pression. En effet, l'examen des courbes températures - pression en vapeur saturée devait donner des températures plus basses. Nous pensons pouvoir l'expliquer dans le cas présent par le fait que notre jauge était branchée en dérivation sur la conduite de la pompe et séparée de la cuve par le piège; il semble donc normal qu'elle ait indiqué un vide plus poussé que le vide réel de la cuve.
- Le vide de 10^{-3} que nous obtenons en fin d'opération, alors que la température est remontée à + 14°; qui constitue un élément d'appréciation du taux d'humidité résiduel.

Nous avons ensuite soumis chacun des lots ainsi traités au protocole d'essai suivant :

A/ <u>Contrôle de non contamination par ensemencement sur les milieux suivants</u> :

Gélose Bouillon Martin	Résultat -
Eau peptonée à 10 pour mille	-
Bouillon Martin	-
Milieu Truche	Culture très peu abondante
Milieu "Brain Heart Infusion"	Léger trouble
Tube Pomme de Terre	-

Les résultats indiqués sont ceux donnés par un tube non contaminé.

../..

B/ Contrôle d'efficacité par la Méthode des Dilutions -

Lorsque nous recueillons la suspension bactérienne centrifugée dans quatre pots d'un litre, nous conservons l'un d'eux correspondant au même volume de culture centrifugée que les autres pour nous servir d'étalon. La suspension reprise par Q.S. d'eau distillée stérile est immédiatement ensemencée dans un tube de milieu de culture suivant le procédé ci-dessous :

A l'aide de matériel stérile, un millilitre de suspension fraîche où le contenu d'une ampoule lyophilisée à vérifier est dilué avec Q.S. de milieu spécial pour obtenir 10 ml.

A partir de cette dilution et en prélevant, chaque fois, un ml de la dilution précédente avec une pipette stérile n'ayant pas encore servi, on dilue à nouveau à 10 ml.

Nous obtenons, ainsi, un certain nombre de tubes donnant une approximation du nombre de germes contenus au départ en recherchant quel est le tube de dilution la plus grande, où la culture se développe encore.

Il faut, en effet, qu'il y ait un minimum de 10^n germes vivants dans la première dilution, n étant le numéro du tube de dilution la plus grande donnant lieu à une culture pour que le prélèvement ayant servi à ensemencer le dernier tube, contienne au moins un germe reproductible.

La méthode des dilutions présente l'inconvénient d'être peu précise lorsqu'on ne veut pas être obligé de faire, pour chaque essai,

un nombre trop important de dilutions. Nous nous trouvions être dans ce cas, puisque notre travail a été, avant tout, orienté dans la recherche des conditions optima de lyophilisation entraînant, par ce fait, de nombreux essais techniques avec leurs corollaires obligatoires de culture et de contrôle.

Nous nous sommes attachés, selon un procédé très classique, à doubler notre lecture visuelle d'une lecture électrophotométrique ayant pour but de déterminer, avec une précision et une certitude plus grande, la dernière dilution donnant lieu à une culture.

Ce procédé est le suivant :

Après 48 heures de culture à l'étuve à 37°, nous ajoutons V gouttes de solution de Formol à 40 %. Nous agitons.

Après repos de 15 minutes, nous émulsionnons le culot en roulant le tube entre les mains avant de faire la lecture à l'électrophotomètre de Meunier, réglé sur une longueur d'onde de 5500 Å.

En tenant compte de l'opacité propre du tube de culture non ensemencé, nous pouvons déterminer le dernier tube donnant culture lorsque l'opacité obtenue est largement supérieure à la marge d'erreur relative que l'on peut attendre de la sensibilité propre de l'appareil.

CHAPITRE IV

RECHERCHE d'UN AGENT PROTECTEUR

Cette étude constitue l'une des parties les plus importantes de notre travail et, tout d'abord, qu'est-ce qu'un agent protecteur ? Nous ne saurions mieux le définir que de citer HAUDUROY.

> " Le fait le plus frappant est l'obligation où se trouvent les bactériologistes d'ajouter aux corps bactériens qu'ils soumettent à la lyophilisation un ou plusieurs produits qui vont jouer un rôle majeur dans la survie des germes, corps auxquels j'ai donné le nom de protecteurs".

Notre étude ayant été faite d'une façon assez systématique, nous exposerons, en premier lieu, les résultats donnés par l'expérimentation selon les procédés décrits précédemment et donnerons, en même temps que leur discussion, les hypothèses qui auront guidé notre choix.

Pour faciliter la lecture des tableaux de résultats expérimentaux, nous mentionnerons :

- que les numéros des tubes de dilution correspondant à la puissance de 10 de la valeur de la dilution I = 1/10 II = 1/100 III = 1/1000 etc...
- que les chiffres indiqués donnent le nombre de graduations du tambour de l'électrophotomètre Meunier correspondant à l'opacité de la culture, déduction faite de l'opacité du témoin.
- que, dans la majeure partie de notre travail, nous n'avons pas fait de mesures sur les plus faibles dilutions, considérant que, s'il n'y avait pas de cultures au-delà du III tube, l'effet protecteur pouvait être considéré comme nul.

Vérification de la nécessité d'un Protecteur appliqué au Bacille de Döderlein.

Nous avons opéré avec reprise du culot de centrifugation avec de l'eau distillée stérile à pH différents et avec du sérum physiologique pour éliminer les effets de l'hypotonie du milieu avant la congélation.

TABLEAU n I

	Dilution	I	II	III	IV	V
EAU DISTILLEE pH 7,3	Emulsion avant lyophilisation	+	+	+	+	-
	Essai ampoule soudée sous vide	+	+	-	-	-
	Essai ampoule soudée sous azote	+	+	-	-	-
EAU DISTILLEE ph 6,2	Emulsion avant lyophilisation	+	+	+	+	-
	Ampoule soudée sous vide	-	-	-	-	-
	Ampoule soudée sous azote	-	-	-	-	-
SERUM PHYSIOLOGIQUE	Emulsion	+	+	+	+	
	Ampoule sous vide	+	±	-	-	
	Ampoule sous azote	+	±	-	-	

Certains essais confirment les résultats décrits par les différents auteurs, la perte étant ici très peu différente de 100 %.

Etude de l'effet protecteur de différents Hydrates de carbone à des concentrations variables -

Nous avons repris les Hydrates de Carbone déjà décrits pour leurs effets protecteurs par d'autres auteurs d'une part et avons recherché plus spécialement ceux qui constituaient, pour le Bacille de Döderlein, un élément nutritif. Voici nos résultats :

../..

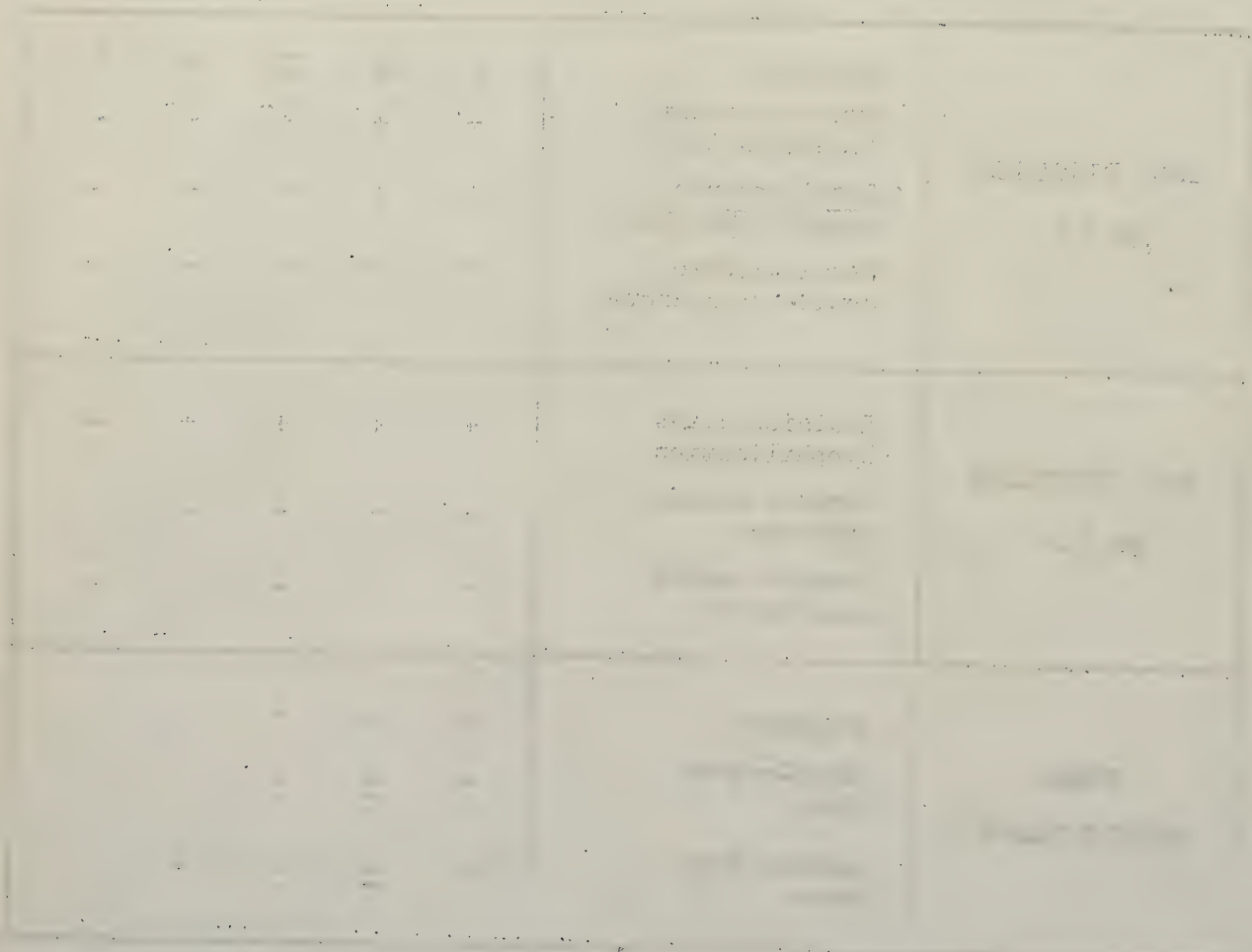

TABLEAU n II

Lactose à 5 % (4)	Dilutions	I	II	III	IV	V	VI	VII
	Avant Lyoph.	+	+	+	+	+	±	±
	Après Lyoph.	+	+	+	+	+	±	-
Lactose à 10 % (5)	Avant	+	+	+	+	+	+	±
	Après	+	+	+	+	±	-	-
Glucose à 5 % (6)	Avant	240	220	78	26	-	-	-
	Après	253	140	90	26	16	-	-
Glucose à 10 % (7)	Avant	246	137	101	29	22	-	-
	Après	226	171	107	65	30	28	-
Levulose à 5 % (8)	Avant	273	218	194	140	121	49	
	Après	274	145	84	29	-	-	
	5 mois après	-	-	-	-	-	-	
Levulose à 10 % (9)	Avant	266	193	176	-	87	47	
	Après	366	206	166	90	43	18	
	5 mois après	-	-	-	-	-	-	
Galactose à 5 % (10)	Avant	198	145	142	92	61	15	
	Après	310	216	195	145	139	95	
	5 mois après	+	+	+	32	14		
Galactose à 10 % (11)	Avant	298	248	211	188	148	56	
	Après	348	233	193	173	-	146	
	5 mois après	+	+	+	38	21	5	
Saccharose 10 % (12)	Dilutions	I	II	III	IV	V	VI	VII
	Avant	163	144	159	101	70	57	
	Après	149	-	139	105	76	69	
	5 mois après	+	+	+	67	31	9	
Inositol à 10 % (13)	Avant	315	209	199	115	73	38	
	Après	299	241	239	209	191	106	
	5 mois après	+	+	+	61	31	23	

Le choix des Hydrates de Carbone utilisés dans les essais décrits ci-dessus, nous a été dicté pour certains d'entre eux, par des études antérieures appliquées à des cellules vivantes.

C'est ainsi que des études de conservation du sperme mentionnent l'utile action du saccharose (LUYET), du Xylose (POLGE et JOLTYS), du Lévulose (SCHAFFNER et CARD). Toutefois, il ne s'agit là que de protecteurs durant la congélation car ces auteurs ne recherchaient que la conservation de courte durée à l'état congelé.

GREAVES a proposé plusieurs milieux enrichis en Hydrates de Carbone, notamment Saccharose à 5 ou à 10 %.

Ce dernier auteur pense que l'adjonction d'Hydrates de Carbone protecteurs à des concentrations appropriées permettrait de maintenir par adsorption, une humidité résiduelle de l'ordre de 1 %, indispensable à la survie.

De la lecture de nos résultats expérimentaux, nous tirerons les observations suivantes :

Par rapport aux essais précédents consignés dans le Tableau n I, essais de lyophilisation sans protecteur, la différence est importante la plupart des composés utilisés permettant une survie immédiatement après la lyophilisation.

Du point de vue de la concentration de l'hydrate de carbone utilisé, nous notons une meilleure conservation en faveur de proportions plus élevées.

Il faut d'ailleurs noter que la concentration des solutions à lyophiliser influe directement sur le déroulement de l'opération car le culot lyophilisé ayant le même volume que la solution à lyophiliser, on comprend facilement que la structure même du culot sera différente suivant la quantité de substrat protecteur qu'elle contient. L'expérience pratique prouve que les concentrations optima sont aux alentours de 10 % à 15 %.

Nous noterons, enfin, que les Hydrates de Carbone donnant les meilleurs effets protecteurs sont aussi les sucres métabolisés par le Bacille de Döderlein.

Nous avons donc, dans ce tableau, le résultat d'une double action effet protecteur durant la lyophilisation, effet nutritif lors du réensemencement.

Nous rappelons, ici, que les Emulsions Etalons n'ont pas été reprises avec la solution protectrice et proviennent de la même culture.

Ainsi, le Glucose, le Galactose et le Saccharose à 10 % donnent des résultats favorables. Certains d'entre eux, Galactose et Saccharose maintenant ces résultats encourageants dans le temps.

L'Inositol, que nous n'avions pas trouvé décrit comme protecteur et qui n'est pas métabolisé par le Bacille de Döderlein, donne également de bons résultats.

Notre expérimentation nous a amenés à étudier ensuite si le mélange de Sucres protecteurs pouvait amener une amélioration.

Nous avons conservé une concentration globale de 10 % et nos résultats sont les suivants :

../..

Tableau n III

		I	II	III	IV	V	VI
Lactose 5 %	Avant	313	228	205	153	-	78
Glucose 5 %	Après	333	222	206	198	161	133
(14)	5 mois après	+	+	+	34	12	-
Lactose 5 %	Avant	230	142	100	85	-	23
Saccharose 5 %	Après	51	52	40	-	-	-
(15)	5 mois après	-	-	-	-	-	-
Lactose 5 %	Avant	238		155	84	74	38
Galactose 5 %	Après	204		116	80	37	17
(16)	5 mois après	+	+	+	34	-	-
Lactose 5 %	Avant	210	145	108	76	70	28
Inositol 5 %	Après	197	145	-	84	46	6
(17)	4 mois après	+	+	+	70	33	7
Lactose 5 %	Avant	291	187	104	76	51	9
Levulose 5 %	Après	165	106	71	17	-	-
(18)	4 mois après	+	++	+	43	22	-
Glucose 5 %	Avant	291	187	104	76	51	9
Inositol 5 %	Après	+	+	+	15	-	-
(19)	4 mois après	-	-	-	-	-	-
Glucose 5 %	Avant	291	187	104	76	51	9
Galactose 5 %	Après	+	+	+	23	9	
(20)							
Glucose 5 %	Avant	291	187	104	76	51	9
Saccharose 5 %	Après	+	+	+	80	31	20
(21)	4 mois après	+	+	+	17	-	-
Levulose 5 %	Avant	234	143	102	82	60	33
Galactose 5 %	Après	+	+	+	-	-	-
(22)							
Levulose 5 %	Avant	234	143	102	82	60	33
Inositol 5 %	Après	+	+	+	72	49	26
(23)	4 mois après	+	+	+	38	14	5
Galactose 5 %	Avant	234	143	102	82	60	33
Saccharose 5 %	Après	+	+	+	15	-	-
(24)							
Levulose 5 %	Avant	234	143	102	82	60	33
Saccharose 5 %	Après	+	+	+	94	84	64
(25)	4 mois après	+	+	+	70	33	20

ETUDE d'AUTRES PROTECTEURS DE LYOPHILISATION

L'efficacité du protecteur en matière de lyophilisation est une notion bien établie qui n'est plus à vérifier; notre étude, s'il en était nécessaire, ne ferait qu'en apporter une preuve supplémentaire. Si, jusqu'alors les Hydrates de Carbone ont été les plus employés, ils n'ont pas été les seuls, GREAVES, dans ses études, a utilisé des milieux plus complexes tel que des dilutions d'albumine d'origine bovine à la concentration de 5 %.

L'application de ce mode d'action n'étant qu'au stade des hypothèses, nous avons préféré recourir à l'étude systématique de l'utilisation des protéines simples, comme les trois acides aminés simples suivants : glycocolle, méthionine, sel de sodium de l'acide glutamine complexes tels que le lait écrémé.

Nos résultats sont consignés dans le tableau n IV.

../..

TABLEAU n IV

		I	II	III	IV	V	VI	VII
Glutamate de Sodium 5 % (26)	Avant	209	165	120	110	95	55	20
	Après	+	+	+	100	70	52	15
	5 mois après	+	+	+	72	56	25	24
Glycocolle 5 % (27)	Avant	205	173	110	85	65	25	-
	Après	+	+	+	-	-	-	-
Méthionine 2,5 % (28)	Avant	205	173	110	85	65	25	-
	Après	+	+	+	-	-	-	-
Lait écrémé (29)	Avant	209	165	120	110	95	55	20
	Après	+	+	+	59	40	13	7

Nous terminerons cette étude des protecteurs par différents milieux composés de mélanges en des dilutions appropriées des protecteurs précédents classés parmi ceux ayant donné les meilleurs résultats (Tableaux : VI - VII - VIII)

TABLEAU n VI

		I	II	III	IV	V	VI	VII
Glutamate 5 % Lactose 5 % (30)	Avant	205	177	150	140	110	61	37
	Après	+	+	+	144	118	62	41
	5 mois après	+	+	+	115	70	29	16
Glutamate 5 % Levulose 5 % (31)	Avant	205	177	150	140	110	61	37
	Après	+	+	+	136	72	52	26
	5 mois après	+	+	+	135	131	71	44
Glutamate 5 % Inositol 5 % (32)	Avant	210	135	93	73	46	15	-
	Après	+	+	+	79	44	21	-
	4 mois après	+	+	+	81	42	22	-
Glutamate 5 % Glucose 5 % (33)	Avant	210	135	93	73	46	15	-
	Après	+	+	+	57	38	9	-
	4 mois après	+	+	+	42	12	5	-
Glutamate 5 % Saccharose 5 % (34)	Avant	210	135	93	73	46	15	-
	Après	+	+	66	66	62	43	
	4 mois après	+	+	131	131	65	54	
Glutamate 5 % Galactose 5 % (35)	Avant	210	135	93	73	46	15	
	Après	+	+	+	60	45	29	
	4 mois après	+	+	+	89	52	28	

TABLEAU n VII

Glycocolle 5 % Lactose 5 % (36)	Avant Après 5 mois après	137 + +	120 + +	118 + +	95 54 50	85 58 27	38 28 16
Glycocolle 5 % Levulose 5 % (37)	Avant Après 5 mois après	127 + +	120 + +	110 + +	95 67 91	75 41 61	25 20 26
Glycocolle 5 % Saccharose 5 % (38)	Avant Après 5 mois après	137 + +	120 + +	118 + +	95 56 183	85 51 152	38 44 98
Glycocolle 5 % Galactose 5 % (39)	Avant Après 5 mois après	127 + +	120 + +	110 + +	95 50 165	75 40 63	25 21 19
Méthionine 5 % Inositol 5 % (40)	Avant Après 4 mois après	120 + +	116 + +	104 + +	104 88 100	66 59 82	48 40 66
Méthionine 5 % Glucose 5 % (41)	Avant Après 5 mois après	120 + +	116 + +	105 + +	104 61 10	66 33 -	48 18 -

TABLEAU n VIII

Lactose 10 % Lait écrémé (42)	Avant	272	216	192	140	60	42
	Après	+	+	+	66	46	36
Galactose 10 % Lait écrémé (43)	Avant	272	216	192	140	60	42
	Après	+	+	+	52	35	29
Glucose 10 % Lait écrémé (44)	Avant	272	216	192	140	60	42
	Après	+	+	+	54	34	18
Levulose 10 % Lait écrémé (45)	Avant	272	216	192	140	60	42
	Après	+	+	+	50	44	26
Inositol 10 % Lait écrémé (46)	Avant	198	143	140	92	61	15
	Après	+	+	+	58	30	20
Méthionine 2,5 % Lait écrémé (47)	Avant	198	143	140	92	61	15
	Après	+	+	+	40	25	13
Glycocolle 10 % Lait écrémé (48)	Avant	198	143	140	92	61	15
	Après	+	+	+	30	17	-
Saccharose 10 % Lait écrémé (49)	Avant	247	175	120	106	85	69
	Après	+	+	+	37	15	12

D'autres protecteurs inertes ont été utilisés, protecteurs choisis par nous, en vue d'essayer de vérifier une autre hypothèse, celle de GREAVES

"Le protecteur permet de conserver, par adsorption, une humidité résiduelle indispensable."

Ces produits sont la gélatine, la gélose et l'un de ses dérivés, l'alginate de sodium. Les résultats, nous devons le dire, sont assez décevants et décrits dans le tableau V.

TABLEAU n V

Alginate de Sodium 0,5 % (50	Avant	149	171	143	105	71	31
	Après 5 mois	+	+	+	100	78	18
		+	+	-	-	-	-
Gélose 0,5 %	Avant	149	171	143	105	71	31
	Après	+	+	+	45	8	6

En résumé, nous pouvons déduire de la lecture un peu aride de tous ces résultats expérimentaux, les notions suivantes :

- Au stade préliminaire de congélation, il convient de respecter les notions classiques d'isotonie, mais elles ne suffisent pas à assurer, à elles seules, une survie convenable après lyophilisation.

- Au stade de la lyophilisation, les composés pouvant jouer le rôle de protecteurs sont certainement très nombreux. Notre étude systématique n'a pu explorer le rôle que de certains d'entre eux.

Il convient, lorsqu'on se sert de protecteur dans la lyophilisation de bactéries vivantes, de ne pas négliger le rôle nutritif du protecteur lors du réensemencement qui pourra influer sur la numération des bactéries "survivantes".

D'un point de vue qualitatif, si les hydrates de carbone protecteurs les plus connus se sont montrés parmi les meilleurs; tels : le Lactose, Galactose, Saccharose, d'autres composés voisins et non utilisés encore dans ce but à notre connaissance, ont donné d'excellents résultats, tel l'Inositol.

Si, enfin, les protides complexes, albumine d'oeuf, lait écrémé, ont été souvent décrits, ils ne nous ont pas donné de meilleurs résultats que des acides aminés simples ; en particulier l'acide glutamique sous forme de glutamate de sodium.

../..

Le mélange à des concentrations adéquates de ces différents corps a conduit à de très bons résultats à tels points, que nous les avons retenus pour des essais cliniques, vérifications "in vivo" de nos résultats de laboratoire sur des bactéries conservées à l'état sec, depuis plus d'un an.

Terminons, sur l'utilisation des substances inertes "adsorbant d'humidité", dont l'action s'est montrée très décevante dans notre étude.

CHAPITRE V

INFLUENCE DE LA CONGELATION

L'objet de ce court chapitre, n'est que la vérification qui nous a semblé indispensable de l'étude, sur une même récolte de Bacille de Döderlein, de l'influence de l'abaissement de température lors de la congélation, sur la survie.

Nous n'avons, à dessein, choisi que deux températures; car elles constituent les extrèmes pratiquement et couramment employés dans ce genre de travail.

Nous avons recherohé, également, si la conservation, durant quelques heures, à l'état congelé, avait une influence.

Nos résultats sont consignés dans le tableau IX. Il ressort, de sa lecture, que les résultats sont sensiblement équivalents.

../..

TABLEAU n IX

	I	II	III	IV	V	VI	VII
Emulsion	+	+	+	193	147	76	48
Après congélation à - 15°	+	+	+	149	112	63	29
Après congélation à - 30°	+	+	+	191	120	16	-
Après congélation à - 30 et conservation 24 h. à - 27°	+	+	+	162	118	59	10

CHAPITRE VI

INFLUENCE DE LA LYOPHILISATION SUR LA MORPHOLOGIE et la REPRISE DE LA CULTURE DU BACILLE

Nous avons voulu étudier, dans ce court chapitre, l'influence possible de la lyophilisation sur la reprise des cultures d'une part et sur la morphologie des germes d'autre part.

Notre protocole d'expérimentation a été le suivant :

Comparaison à ces deux points de vue de :

- Bacilles de Döderlein lyophilisés depuis au moins six mois... ⟶ A
- Bacilles de Döderlein récemment lyophilisés (quelques jours). ⟶ B
- Bacilles de Döderlein involués par conservation en milieu appauvri (Ogives Dod) et ensemencés sans repiquage depuis six mois ..... ⟶ C
- Bacilles de Döderlein de même préparation que les précédents, mais quelques jours après ensemencement ..... ⟶ D
- Bacilles de Döderlein formes longues, obtenues à partir de culture sur un milieu riche et conservés quelques jours en ampoules scellées ..... ⟶ E

L'étude comparative en fonction du temps est assez intéressante et résumée dans le tableau suivant :

Culture après :	12 heures	24 heures	36 heures	48 heures	72 heures
A	±	±	±	++	+++
B	±	±	±	++	+++
C	±	±	++	+++	
D	±	++	+++		
E	±	++	++++		

Quant à l'étude morphologique, nous pouvons la présenter ainsi :

../..

Culture après :	12 heures	24 heures	36 heures	48 heures	72 heures
A	Coccis et fins Bacilles	idem	Bacilles en chaînettes		
B	Coccis et fils Bacilles	idem	Bacilles en chaînettes		
C	Coccis et fins Bacilles	Bacilles en chaînettes			
D	Coccis et fins Bacilles	Bacilles en chaînettes			
E	Coccis et fins bacilles en chaînettes				

Ces essais ont été répétés trois fois dans les mêmes conditions, avec des résultats exactement superposables.

Il est aisé d'en déduire que la reprise du bacille lyophilisé se fait dans les mêmes conditions que celles d'un bacille vivant; à la différence près : d'un important retard dans le développement.

Quant à la morphologie du germe, nous la retrouvons semblable après 48 heures de décalage.

CHAPITRE VII

ESSAIS CLINIQUES

Avant d'exposer, dans ce chapitre, les observations cliniques qui confirment la reprise d'activité "in situ" du Bacille que nous avons lyophilisé, il nous a semblé indispensable, sans revenir sur ses caractéristiques bactériologiques, de rappeler les phases de la vie de ce germe saprophyte par rapport à la vie génitale de la femme.

Après la description du Bacille par Döderlein, dans un travail publié en 1892, de nombreux auteurs ont entrepris de classer les différents types de flores qu'on peut rencontrer dans le vagin de la femme, d'après le "degré de pureté" en Bacille de Döderlein.

MAUNU AF HEURLIN, propose la classification suivante, encore très employé actuellement.

- Degré de pureté :

  I Le Bacille de Döderlein est à peu près seul dans le vagin.

- Degré de pureté :

  II Le Bacille de Döderlein est à peu près identique au précédent. Le Döderlein prédomine nettement, on note le plus souvent la présence de colibacilles peu nombreux.

- Degré de pureté :

  III Ici, le Bacille de Döderlein n'est plus dominant; on peut voir nombre de bacilles gram négatifs ou positifs, ainsi que des bâtonnets gram négatifs. Le plus souvent,on trouve des streptocoques, des staphylocoques et divers anaérobies.

- Degré de pureté :

  IV Aucun Bacille de Döderlein, seulement de nombreux germes très variés.

De nombreuses recherches furent ensuite entreprises pour savoir à quel degré de pureté rattacher la flore génitale aux divers âges de la vie sexuelle de la femme.

../..

De ces travaux, il résulte que le vagin paraît stérile à la naissance. Au bout de 24 heures, apparaît une flore bactérienne répondant aux caractéristiques du Bacille de Döderlein et persistant jusqu'au 15ème jour.

Durant tout ce temps de l'impuberté absence totale de bacille de Döderlein; la flore, très peu abondante, est alors constituée de germes variés, staphylocoques, entérocoques, diplocoques, bâtonnets gram négatifs.

Dès l'apparition des premiers signes de la puberté, apparition d'une flore de degré I; c'est-à-dire : à peu près uniquement composée de ces bacilles vaginaux.

Dès lors, et jusqu'à la ménopause, la prédominance des Bacilles de Döderlein est nette chez la femme réglée et saine avec, toutefois, une variation cyclique décrite par CHAPPAZ, après examen quotidien de frottis vaginaux au cours du cycle.

> "Dès la fin des règles, notre frottis nous montre, entre les cellules des leucocytes et quelques hématies, une fine poussière gram positive. Nous ne voyons plus de Bacilles de Döderlein. Les jours suivants nous voyons apparaître des cocco-bacilles, renflés gram positifs, qui répondent à la morphologie décrite par CRUICKCHANK. Puis, assez rapidement, ces cocco-bacilles deviennent plus abondants ou ils se transforment en bâtonnets qui ne sont autre que la forme courante du Bacille de Döderlein".

Leur taille a tendance à s'accroître pendant que le cycle se poursuit.

Le Bacille vaginal a donc, lui aussi, un cycle synchroniquement adapté au cycle oestrien de la femme.

Chez la ménopausée, nous trouvons une flore pure dans les mois qui suivent la ménopause, la flore du vagin sénile étant le plus souvent nulle.

Grâce à ces travaux, Monsieur CHAPPAZ a été en mesure de proposer une classification simplifiée des degrés de pureté de la flore vaginale.

../..

1er degré — Bacille vaginal très abondant excluant la présence de tout autre germe. On la rencontre chez la femme enceinte, chez la fillette nouvelle née, chez la fillette prépubère.

2ème degré — Bacille vaginal moyennement abondant, seul ou très nettement prédominant sur quelques autres germes rencontrés chez la femme adulte saine réglée et la femme ménopausée depuis plusieurs années.

3ème degré — Bacille vaginal totalement absent ou difficile à déceler parmi d'innombrables germes variés. Nous rangeons aussi, dans ce troisième degré, les cas où la flore vaginale est pratiquement nulle. On le trouve chez la fillette impubère, la femme ovariectomisée et la femme sénile.

Rappelons, pour terminer, l'une des caractéristiques essentielles du Bacille : la fermentation des sucres, en particulier du Glycogène transformé en acide lactique, qui communique à la sécrétion vaginale normale sur pH acide compris entre : 4,2 et 5.

Nos essais cliniques, effectués dans le Service de la Maternité de l'Hôpital de REIMS, sous la direction de Monsieur CHAPPAZ, se sont déroulés suivant le processus suivant :

- Malades choisies en fonction de leur flore vaginale (flore degré III) en période de vie génitale active.

../..

- Implantations de bacilles lyophilisés, dilués avec une quantité suffisante de sérum glucosé, cette suspension étant introduite dans une Ogive creuse contenant un granulé de lactose stérile. Les implantations sont faites à des intervalles de 48 à 72 heures, après un frottis de contrôle.

  Nous avons utilisé des Bacilles lyophilisés depuis plus d'un an, en suivant le processus qui a été décrit plus haut et en utilisant le mélange glutamate de sodium lactose.

Sur dix observations qui peuvent être retenues, nous avons enregistré avec cette méthode de réensemencement du Bacille de Döderlein, six résultats probants (Observations : II, III, V, VII, VIII, IX) - trois résultats peu concluants (Observations : I, IV, X) - un échec.

OBSERVATIONS

Observation I

Mme Dev ...
24 ans Multipare
Consulte pour cervicite le 7. 3. 62
Frottis vaginal le 7.3.62 Flore III
1ère implantation
Frottis vaginal le 10.3.62 Flore II
2ème implantation
Frottis vaginal le 14.3.62 Flore II bacilles courts assez nombreux
Le 17.3.62 interruption de l'essai par une hémorragie (Fausse couche)
Frottis vaginal le 20.3.62 Flore III
Le traitement doit être interrompu cervicite avec pus très abondant qui gêne la prolifération du Bacille de Döderlein.

Essai peu concluant avec toutefois apparition du Bacille dès la première implantation.

Observation II

Melle Lec ...
22 ans vierge
Frottis vaginal le 14.3.62 Flore II avec bacilles assez nombreux
1ère implantation
Frottis vaginal le 17.3.62 Flore I avec bacilles de forme longue
2ème implantation
Frottis vaginal le 20.3.62 Flore I avec bacilles de forme longue
3ème implantation
Frottis vaginal le 30.3.62 Flore I avec bacilles de forme longue
4ème implantation
Deux autres frottis et implantations effectués le 10/4 et le 14/4 ont donné les mêmes résultats flore pure à bacilles Gram Positif abondants forme longue.

Essai concluant l'implantation enrichit une flore pauvre.
Résultats maintenus dans le temps malgré l'espacement des dernières implantations.

Observation III

Mme Dep...
Grossesse près du terme
Frottis le 27/III/62 Flore III avec pus et Trichomonas
lère implantation sans autre traitement.
Frottis vaginal le 29/III/62 Flore III avec pus et Trichomonas
2ème implantation
Frottis vaginal le 31/III/62 Flore II Trichomonas
3ème implantation + Trichomycine locale
Frottis vaginal le 2/IV/62 Flore II
Accouchement le 3/IV/62.

Essai avec résultat net apparition du bacille à la dernière implantation dans un milieu de pH défavorable dû à la présence du trichomonas.

Observation IV

Mme Mor...
Frottis le 29/III/62 Flore III sans Trichomonas
lère implantation
Frottis vaginal le 3/IV/62 Flore I avec bacilles forme longue et quelques-uns en chaînettes. 2ème implantation
Revue le 10/IV/62 au dernier jour de ses règles Flore III avec
3ème implantation
Frottis vaginal le 13/IV/62 Flore III
4ème implantation
La malade n'est plus revue.
Résultat probant au début interruption par la menstruation entraînant une disparition normale du Bacille. Traitement insuffisamment prolongé après.

Observation V

Melle Bou...
Frottis vaginal le 3/IV/62 Flore III avec Trichomonas
lère implantation + traitement Trichomycine Flagyl
Frottis vaginal le 6/IV/62 Flore III avec Trichomonas
2ème implantation
Frottis vaginal le 10/IV/62 Flore III très pauvre en Trichomonas
3ème implantation
Frottis vaginal le 12/IV/62 Flore I très riche en formes longue
4ème implantation
La malade revient après ses règles le 19/IV/62 Frottis vaginal Flore I avec petits bacilles dès le lendemain de l'arrêt de la menstruation.

Essai très concluant.

Observation VI

Mme Rob...

Frottis vaginal le 4/IV/62 Flore III
1ère implantation
Frottis vaginal le 6/IV/62 Flore III
2ème implantation
Frottis vaginal le 10/IV/62 Flore III
3ème implantation
Frottis vaginal le 13/IV/62 Flore III
4ème implantation
Frottis vaginal le 16/IV/62 Flore II
bacilles peu nombreux mais nets.

Cet essai peut être considéré comme un échec.

Observation VII

Mme Cog...
47 ans
Frottis vaginal le 22/IV/62 Flore III
1ère implantation
Frottis vaginal le 14/IV/62 Flore I
2ème implantation
Frottis vaginal le 17/IV/62 Flore I Bacilles longs et nombreux
3ème implantation
Frottis vaginal le 21/IV/62 Flore I persistante
4ème implantation
Frottis vaginal le 26/IV/62 Flore II

Résultat très probant

Observation VIII

Mme Poi...

23 ans
Frottis vaginal le 12/IV/62 Flore III
1ère implantation
Frottis vaginal le 14/IV/62 Flore II
2ème implantation
Frottis vaginal le 17/IV/62 Flore II avec bacilles courts
3ème implantation
Frottis vaginal le 20/IV/62 Flore I bacille de taille moyenne
4ème implantation
Frottis vaginal le 27/IV/62 Flore I persistante

Essai concluant.

Observation IX

Mme Mal...

Grossesse (8ème mois)
Frottis vaginal le 12/IV/62 Flore III
1ère implantation
Frottis vaginal le 14/IV/62 Flore II avec petits et grands bacilles de Döderlein
2ème implantation
Frottis vaginal le 17/IV/62 Flore III
3ème implantation
Frottis vaginal le 20/IV/62 Flore II mais très peu de bacilles de Döderlein
Frottis vaginal le 24/IV/62 Flore I

Essai concluant.

Observation X

Mme Deg...

Grossesse vomissements incoercibles
Frottis vaginal le 13/IV/62 Flore III
1ère implantation
Frottis vaginal le 17/IV/62 Flore III
2ème implantation
Frottis vaginal le 20/IV/62 Flore II quelques bacilles de Döderlein
3ème implantation
Frottis vaginal le 21/IV/62 Flore II très petits bacilles

Résultat peu concluant.

C O N C L U S I O N S

Nous nous sommes proposé d'étudier, dans ce travail :

a) Dans quelle mesure le Bacille de Döderlein pouvait conserver une efficacité suffisante après lyophilisation.

b) Un véhicule commode et pratique pour l'administration vaginale pouvant remplacer les ovules jusqu'ici utilisées et dont la manipulation comportait quelques inconvénients.

Pour ce faire, nous avons d'abord précisé une technique de lyophilisation qui nous permette d'obtenir une reprise d'activité convenable du Bacille de Döderlein.

Les points essentiels de cette technique sont les suivants :

A/ Ce germe étant relativement résistant, il ne semble pas que la rapidité de la congélation, ni la température à laquelle il faille descendre, soit un facteur primordial.

B/ La notion de protecteur mise en évidence par HAUDUROY est primordiale et, parmi eux, nous devons faire une place à part aux hydrates de carbone métabolisés par le bacille qui sont à la fois protecteur et de lyophilisation et facteur de nutrition à la reprise de culture (lactose).

C/ Notre étude systématique nous a permis de mettre en évidence cette propriété de certains corps, tels que l'Inositol par exemple, jamais décrits à notre connaissance.

D/ Néanmoins, le protecteur qui s'est montré le plus efficace, est le mélange glutamate de sodium 5 % lactose 5 %.

E/ Ces protecteurs nous ont permis de conserver des Bacilles de Döderlein durant une année avant de les soumettre à l'essai clinique.

D'autre part, la reprise d'activité du Bacille de Döderlein lyophilisé a été vérifiée par le laboratoire. Nous avons pu ainsi mettre en évidence un retard dans la reprise de culture par rapport à des Bacilles de Döderlein involués par culture sur milieu pauvre; ce retard est en moyenne de l'ordre de 48 heures, mais fait important, il ne s'agit que d'un retard

dans la reprise de culture et non pas d'une diminution du nombre des Bactéries conservées vivantes à l'état sec.

Le laboratoire a permis également d'apporter la preuve que la lyophilisation n'a aucune influence sur la morphologie des germes, ni sur leurs caractéristiques bactériologiques.

La clinique nous a permis de confirmer l'activité réelle du Bacille de Döderlein lyophilisé, capable d'assurer un réensemencement efficace du vagin. La présentation, sous forme d'une poudre sèche du Bacille de Döderlein permettra son incorporation dans un comprimé de lactose, véhicule parfaitement adapté à son développement.

Vu le Doyen :

BINET

Vu le Président :

FUNCK-BRENTANO

Vu le Recteur :

ROCHE

B I B L I O G R A P H I E

ROTHER - Der Bact. Vagin. Dod. u der Abbandes des Glycog. im genit. traktus. Zentz. f. Gyn. Leipzig. 1925 T. 49.

SCHRODER - Secr. vaf. (Deutsch. Med. Woch. Leipzig 56 juill. 1930)

CRUICKSCHANK - Dod. Vag. Bacil. (Contrib. to stud. of Lactobacilli.) j. Hyg. 31. 375.381.

BROWN & REDOWITZ - Dod. Bacillus cult. a serole studien. (Am. j. Obst. and Gyn. 27. 795.798 may 1934)

CHAPPAZ - Hormones Sexuelles et Biologie du Vagin. (Vigot Frères 1946)

GREAVES - Traité de Lyophilisation publié sous la direction de L. Rey chez Hermann. Paris.

LUYET - Survival of cells tissues and organisms after ultra-rapid freezing.
Freezing and Drying Symposium. The Institue of Biology London 1931.

POLGE & SOLTYS - Protective Action ofsome neutral solutes during the freezing of bull Spermatozoa and Trypanosomes.
Recent Research in Freezing and Drying.
Blackwell Scientific Publ. Oxford 1960.

HAUDUROY in Traité de Lyophilisation publié sous la direction de L. Rey Hermann Paris.

Deuxièmes Cours Internationaux de Lyophilisation. LYON Sept. 1960.

MARGULIES - La Flore vaginale normale. Thèse Méd. 1939. PARIS

FAUCHART - Rôle de la Carence en Oestrogènes dans l'étiologie de la Vaginite à Trichomonas. Thèse Méd. 1948. PARIS.